

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19678

研究課題名(和文)心筋リプログラミング促進化合物の同定と薬理作用の解明

研究課題名(英文)Chemical cardiac reprogramming and mechanisms

研究代表者

家田 真樹 (Ieda, Masaki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70296557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの心筋リプログラミング効率は低く、また血清入りの培養液を使用するため安全面の課題があった。そこで本研究では無血清培養下で拍動心筋の誘導を促進する化合物を同定し、安全かつ効率の良い心筋直接リプログラミング法を確立することを目的とした。研究の結果、マウス老化線維芽細胞から心筋誘導遺伝子を導入後、ジクロフェナクを添加した無血清培地で培養をすると、通常の培地と比較して約3-4倍心筋誘導が改善した。またその分子機構として、プロスタグランジンE2を介する炎症と線維化シグナル経路の抑制が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行うケミカルパイロロジーは、同定した機能性化合物を基に、心筋リプログラミング誘導薬剤を開発できるのみならず、化合物の標的分子を同定することによって心筋リプログラミングの実行メカニズムを明らかにすることができる。高い心筋誘導効率を示す化合物を発見できれば、心筋リプログラミングに必要な遺伝子を減らして、将来的には薬剤のみで心筋誘導ができるようになる可能性がある。このように本研究は心筋リプログラミングとケミカルパイロロジーという共に新しい研究の融合領域を切り拓き、従来の心臓治療に大きな変革や転換を与える、独創的かつ革新的な研究である。

研究成果の概要(英文)：Direct cardiac reprogramming from fibroblasts can be a promising approach for disease modeling, drug screening, and cardiac regeneration in pediatric and adult patients. In this study, we screened 8400 chemical compounds and found that diclofenac sodium (diclofenac), a non-steroidal anti-inflammatory drug, greatly enhanced cardiac reprogramming in combination with Gata4, Mef2c, and Tbx5 (GMT) or GMT plus Hand2. Intriguingly, diclofenac promoted cardiac reprogramming in mouse postnatal and adult tail-tip fibroblasts (TTFs), but not in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Mechanistically, diclofenac enhanced cardiac reprogramming by inhibiting cyclooxygenase-2, prostaglandin E2/prostaglandin E receptor 4, cyclic AMP/protein kinase A, and interleukin 1 signaling and by silencing inflammatory and fibroblast programs, which were activated in postnatal and adult TTFs.

研究分野：循環器内科

キーワード：リプログラミング 心臓再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

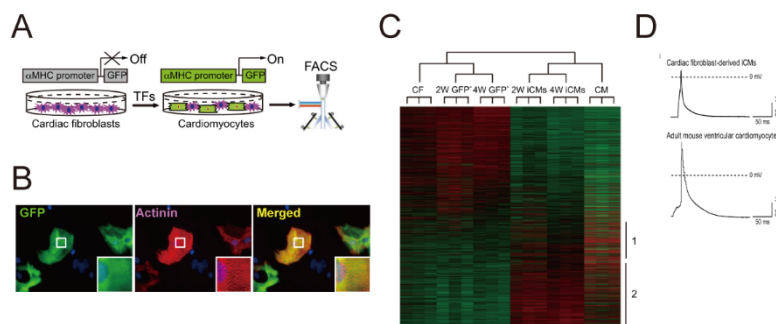
1. 研究開始当初の背景

心臓病の新しい治療として再生医療が期待されている。iPS細胞(induced pluripotent stem cells)をはじめとした幹細胞は心筋細胞作製のための有力な細胞源として世界中で活発に研究が行われている。ES、iPS細胞からの心筋作製法は、従来は血清入り培養液を使用して、胚葉体浮遊培養法(EB浮遊培養)で行ったが、心筋分化効率は1~5%と低かった。近年は、心臓発生の過程を模倣し、Activin、BMP、Wnt、FGF、VEGFなどのシグナル伝達経路を、化合物やサイトカインなどを用いて時期特異的に増強あるいは抑制する心筋作製法に発展しており、心筋分化効率は無血清培養条件下で数10%まで改善している。しかしながら、幹細胞使用に伴う腫瘍形成の可能性、移植細胞の組織への長期生着、周囲心筋との電氣的結合などの問題は依然克服すべき課題として残っている。

これに対して我々は全く新しい心臓再生法として、心臓内の線維芽細胞をその場でiPS細胞を介さずに直接心筋細胞に分化転換する心筋リプログラミング法を開発した。この心筋リプログラミング法が可能になれば、1. 工程が単純・簡便・時間も短縮できる 2. 未分化細胞を経由しないため腫瘍出現がない 3. その場で心筋再生するので細胞移植が必要ない、など多くの利点があり幹細胞を用いた細胞移植法の課題を一気に解決できる。我々はこれまでにCREST(平成27年度終了、事後評価A)による研究サポートを受け、世界で初めて心筋特異的な3つの転写因子Gata4、Mef2c、Tbx5が心筋リプログラミング因子であることを発見した(図1, Ieda et al, Cell 2010)。また生体内に同因子を導入して、病変部の心臓線維芽細胞を直接心筋へ転換して心臓再生できることを示した(Inagawa et al, Circ Res 2012)。ヒト細胞では、Gata4、Mef2c、Tbx5に2つの遺伝子(Mesp1、Myocd)を加えた5因子、あるいはmiR-133を加えた6因子で心筋リプログラミングできることを示し、さらにそのメカニズムを明らかにした(Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014)。また特定のサイトカインを添加することで心筋リプログラミング効率を改善することに成功している(Yamakawa et al, Stem Cell Reports 2015)。しかし従来の血清入り培養液を使用する方法は心筋リプログラミングの効率が低く、また臨床応用では安全面で課題があった。

(図1) 心筋リプログラミング遺伝子の発見

(A)心筋誘導因子のスクリーニング (B-D)誘導心筋細胞の解析



2. 研究の目的

心臓疾患の新しい治療として心臓再生法の開発が求められている。心筋作製法には線維芽細胞から山中4因子を用いてまずiPS細胞を作製して心筋に分化する方法と、線維芽細胞から心筋を直接作製する心筋リプログラミング法がある。この心筋リプログラミング法は、1. 工程が単純なため心筋作成が簡便で時間も短縮できる 2. 未分化細胞を経由しないため腫瘍の出現リスクがない 3. 心臓内に存在する線維芽細胞を直接その場で心筋にできれば細胞移植することなく線維化病変を元に戻すことも可能になるなど多くの利点がある。我々はこれまでに世界で初めて心筋リプログラミング遺伝子を発見し、さらにマウス心筋梗塞で心筋リプログラミングにより心臓再生に成功しており、本研究領域の発展を先導してきた(Ieda et al, Cell 2010, Inagawa et al, Circ Res 2012, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014, Sadahiro et al., Circ Res 2015, Yamakawa et al., Stem Cell Reports 2015)。

この心筋リプログラミング法は独自に開発した革新的な心臓再生法であり、再生医療実現を大きく前進させることが期待できる。しかしながら臨床への応用を考えたときに、現在の課題として血清入りの培養液の使用や転写因子導入に伴う安全面の問題、機能的に成熟した心筋細胞

の誘導効率が低い、心筋リプログラミングの分子メカニズムも依然不明な点が多いなど解決すべき課題がある。また、これまで化合物を用いて心筋リプログラミングに成功したという報告はない。そこで本研究では無血清培養下で化合物ライブラリーを用いて網羅的スクリーニングを行い、線維芽細胞から心筋への誘導を促進する新規化合物を同定する。さらに化合物による心筋リプログラミングの分子メカニズムを明らかにし、導入する転写因子を減らして安全な心臓再生医療実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 化合物ライブラリーを用いた心筋リプログラミング促進化合物のスクリーニング

心筋誘導化合物のスクリーニングは、心筋リプログラミング因子を同定できる α MHC-Cre/tdTomato トランスジェニックマウス線維芽細胞を用いて行う。マウス線維芽細胞から心筋細胞誘導を促進する化合物を同定するため、連携研究者の東京医科歯科大学の清水重臣教授から供与される 10000 種類の化合物ライブラリーを用いて網羅的にスクリーニングする。具体的には心筋細胞のみ GFP を発現する α MHC-Cre/tdTomato トランスジェニックマウスの線維芽細胞に Gata4/Mef2c/Tbx5 を遺伝子導入して、翌日から無血清培地に化合物を添加し、心筋レポーターの発現を Cell image analyzer で測定する。ヒットした化合物に関しては 4 週後に拍動心筋の数を計測して、機能的に成熟した心筋細胞の誘導を定量的に計測する。

(2) 化合物を用いて作製した誘導心筋細胞の解析

次にヒット化合物を用いて得られる誘導心筋細胞を分子生物学的および生理機能的に解析して、真に機能的な心筋細胞を誘導する化合物を選定する。化合物を用いて誘導した心筋細胞で、様々な心筋特異的遺伝子の発現や横紋筋構造の形成を QRT-PCR や免疫染色で確認する。心筋蛋白の発現や心筋特異的蛋白の発現を FACS で定量的に解析する。また心筋に特徴的な生理機能として細胞内カルシウム濃度の変化を Rhod-3 を用いて解析する。さらに活動電位の測定など詳細な生理機能の解析を行い、血清培地で誘導した心筋細胞と比較する。これらの実験手技はこれまでも行っており、技術的問題はない (Ieda et al, Cell 2010, Wada et al, PNAS 2013, Muraoka et al, EMBO J 2014, Yamakawa et al., Stem Cell Reports 2015)。

(3) 化合物の薬理作用と心筋リプログラミングの分子メカニズム解明

化合物の標的分子や化合物の作用機序を解明して心筋リプログラミングの分子メカニズムを解明する。化合物添加による遺伝子発現変化をアレイで解析して、変化遺伝子群を GO term 解析や Pathway 解析で機能評価する。さらに安全かつ効率的な心筋リプログラミングを目指して導入する転写因子や化合物を減らす検討をする。

4. 研究成果

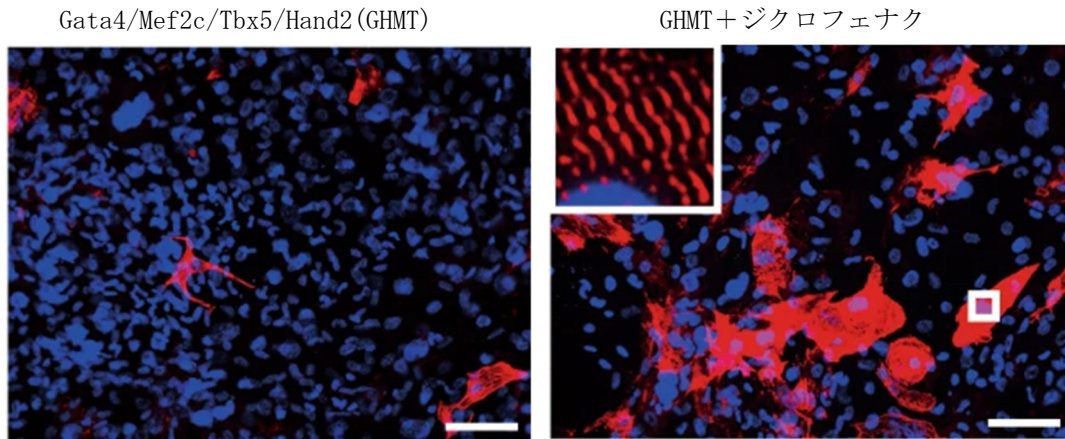
(1) ジクロフェナクが成体期線維芽細胞での心筋誘導を促進することを発見スクリーニング

α MHC-Cre/tdTomato マウス由来の新生児期線維芽細胞に、リプログラミング因子を遺伝子導入し、8400 種の化合物ライブラリーを用いて心筋誘導促進化合物をスクリーニングした。スクリーニングの結果、新生児期線維芽細胞から心筋誘導を促進する 4 種の化合物を同定した。さらにスクリーニングを進めた結果、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) として知られるジクロフェナクを添加することで、有意な心筋誘導が促進されることが明らかとなった。

Gata4/Mef2c/Tbx5/Hand2 (GHMT) にジクロフェナクを添加することで、心筋特異的タンパク質や遺伝子発現は上昇し、心筋特異的な横紋筋構造の明瞭化を認めた (図 2)。またより成熟した

心筋の特徴である自律的拍動を示す心筋細胞も約 4 倍に増加しており、ジクロフェナクにより心筋細胞の誘導が促進されるだけでなく、誘導された心筋細胞の成熟も促進されることが示された。ジクロフェナク投与による細胞毒性は認めず、ジクロフェナク投与期間が心筋誘導初期でのみ有効であることから、誘導促進の機序として、誘導初期でリプログラミングを促進していることが示唆された。

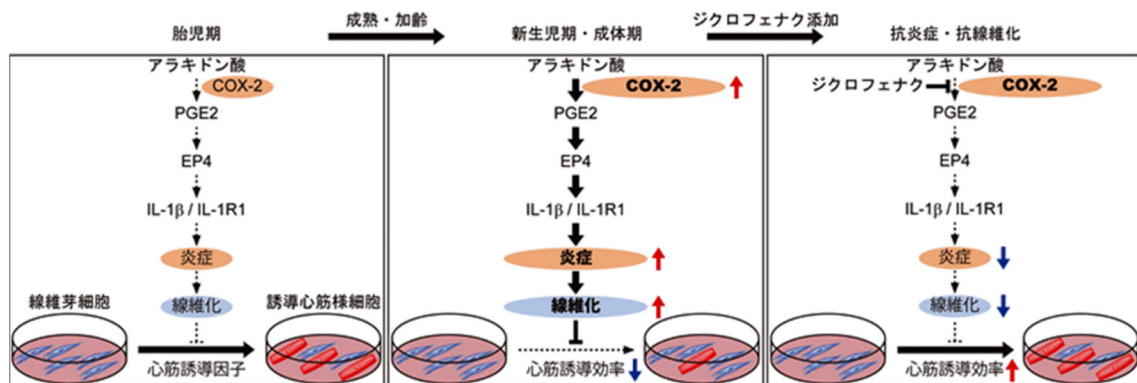
(図 2) ジクロフェナクによる心筋誘導促進



(2) ジクロフェナクが心筋誘導を促進するメカニズムの解明

興味深いことに、ジクロフェナクによる心筋誘導促進効果は新生児期/成体期線維芽細胞に特異的であり、従来の胎児線維芽細胞では促進効果を認めなかった。我々は線維芽細胞が加齢に伴い、アラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 やプロスタグランジン E2 (PGE2)、PGE2 受容体の EP4 のシグナル発現が亢進することを明らかにし、ジクロフェナクによる COX-2 阻害が、誘導促進の機序であると仮説を立てた。その後の検討により、加齢とともに活性化される線維芽細胞における、COX-2/PGE2/EP4/IL-1 β /IL-1R1 の経路が心筋誘導を抑制していることを明らかにし、ジクロフェナクはこの経路を抑制することで心筋誘導を促進させることを示した(図 3)。

(図 3) ジクロフェナクは抗炎症・抗線維化により心筋リプログラミングを促進



引用文献

1. Ieda M et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell 2010;142(3):375-386.
2. Song K et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. Nature 2012;485(7400):599-604.
3. Zhao Y et al. High-efficiency reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes requires suppression of pro-fibrotic signalling. Nat Commun 2015;6:8243.
4. Chen JX et al. Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using

Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* 2012;111(1):50-55.

5. Muraoka N et al. Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. *Nat Commun* 2019;10(1):674.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tani H, Sadahiro T, Ieda M	4. 巻 19
2. 論文標題 Direct Cardiac Reprogramming: A Novel Approach for Heart Regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092629.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Isomi M, Sadahiro T, Ieda M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Progress and Challenge of Cardiac Regeneration to Treat Heart Failure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 97-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2018.10.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sadahiro T, Isomi M, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tamura F, Tani H, Tohyama S, Fujita J, Miyoshi H, Kawamura Y, Goshima N, Iwasaki YW, Murano K, Saito K, Oda M, Andersen P, Kwon C, Uosaki H, Nishizono H, Fukuda K, Ieda M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Tbx6 Induces Nascent Mesoderm from Pluripotent Stem Cells and Temporally Controls Cardiac versus Somite Lineage Diversification.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell.	6. 最初と最後の頁 382-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tani H, Wang L, Qian L, Inoue M, Ide Y, Kurokawa J, Yamamoto T, Seki T, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M	4. 巻 22
2. 論文標題 Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell.	6. 最初と最後の頁 91 ~ 103.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2017.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurotsu Shota, Osakabe Rina, Isomi Mari, Tamura Fumiya, Sadahiro Taketaro, Muraoka Naoto, Kojima Hidenori, Haginiwa Sho, Tani Hidenori, Nara Kaori, Kubota Yoshiaki, Ema Masatsugu, Fukuda Keiichi, Suzuki Takeshi, Ieda Masaki	4. 巻 495
2. 論文標題 Distinct expression patterns of Flk1 and Flt1 in the coronary vascular system during development and after myocardial infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 884 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umei Tomohiko, Yamakawa Hiroyuki, Muraoka Naoto, Sadahiro Taketaro, Isomi Mari, Haginiwa Sho, Kojima Hidenori, Kurotsu Shota, Tamura Fumiya, Osakabe Rina, Tani Hidenori, Nara Kaori, Miyoshi Hiroyuki, Fukuda Keiichi, Ieda Masaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Single-Construct Polycistronic Doxycycline-Inducible Vectors Improve Direct Cardiac Reprogramming and Can Be Used to Identify the Critical Timing of Transgene Expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tai-Nagara Ikue, Yoshikawa Yusuke, Numata Naoko, Ando Tomofumi, Okabe Keisuke, Sugiura Yuki, Ieda Masaki, Takakura Nobuyuki, Nakagawa Osamu, Zhou Bin, Okabayashi Koji, Suematsu Makoto, Kitagawa Yuko, Bastmeyer Martin, Sato Kohji, Klein Rudiger, Navankasattusas Sutip, Li Dean Y., Yamagishi Satoru, Kubota Yoshiaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Placental labyrinth formation in mice requires endothelial FLRT2/UNC5B signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 2392 ~ 2401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.149757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurotsu Shota, Suzuki Takeshi, Ieda Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Direct Reprogramming, Epigenetics, and Cardiac Regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Card Fail.	6. 最初と最後の頁 552 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cardfail.2017.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming toward Cutting-edge Cardiovascular Research
3. 学会等名 International cell therapy conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Cardiac Reprogramming toward Heart Regeneration
3. 学会等名 JSPS-The Royal Society Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Cardiac Reprogramming and Regeneration
3. 学会等名 The 6th Gwangju-Boston Joint Cardiology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration
3. 学会等名 Yonsei Stem cell and Cardiovascular Regeneration Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Mechano-transduction and Direct Cardiac Reprogramming for Heart Regeneration
3. 学会等名 International symposium on mechanobiology with its cutting edge and diversity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Cardiac Reprogramming, Cell Fate Decision, and Heart Regeneration
3. 学会等名 The 27th Hot Spring Harbor International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Direct Reprogramming and Cardiac Regeneration
3. 学会等名 Cell Press Lab Links (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Ieda
2. 発表標題 Cardiac Reprogramming and Heart Regeneration via Mechano-Transduction
3. 学会等名 3rd International symposium on mechanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 村岡直人、家田真樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬ジャーナル	5. 総ページ数 p73-77
3. 書名 メカニカルに注目した新しい心臓再生医療の可能性	

1. 著者名 谷英典、家田真樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 生体の科学	5. 総ページ数 p574-578
3. 書名 心臓の発生・再生・創生	

1. 著者名 家田真樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学出版	5. 総ページ数 p89-97
3. 書名 レジデント	

1. 著者名 刑部里奈、鈴木岳之、家田真樹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 日薬理誌	5. 総ページ数 p276-281
3. 書名 創薬・治療のターゲットとしての細胞分化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----